

\* NOTICES \*

JPO and NCIPF are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.

2.\*\*\* shows the word which can not be translated.

3.In the drawings, any words are not translated.

---

CLAIMS

---

[Claim(s)]

[Claim 1] The ingredient which manufactured according to the process immersed until it carries out the partial dissolution of the baking sea surface bone at the process which calcinates a living body bone (a sea surface bone and compact bone) in 773-1473K, respectively, the process which carries out the full dissolution of the baking compact bone at a with a pH of two or less inorganic acid, and its solution, the process which add a base agent and hold pH to 8-11, the process filter, the process rinse, and the process dry and its production approach.

[Claim 2] The ingredient manufactured according to the process which carries out steam atmosphere heat treatment of the ingredient of claim 1 in 673-1073K, and its production approach.

[Claim 3] The ingredient which manufactured osteogenesis protein (BMP:Bone morphogenetic protein) into the ingredient of claims 1 and 2 according to the process which sinks in, and its production approach.

---

[Translation done.]

\* NOTICES \*

JPO and NCIPi are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.\*\*\* shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

---

DETAILED DESCRIPTION

---

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Field of the Invention] This invention offers the production approach of body tissue origin absorptivity inclination functional composite material of having indispensable biocompatibility and compatibility, absorptivity, bone inductivity, and reinforcement by the latest playback medicine and the technical field of systems engineering, in the medical related industry field about the production approach of the living body high-performance material which carried out altitude effective use of the livestock baking bone.

[0002]

[Description of the Prior Art] In recent years, various living body hard-tissue alternate material is developed for the purpose of the bone reconstruction and osteoanagenesis medicine accompanying arrival of an aging society, or frequent occurrence of a traffic accident. \*\*\*\* and a homogeneous bone permutation are required of the bone deficit sections, such as gnathoschisis, because of tooth migration or embedding ingredient erection. Since an unabsorbent ingredient in the living body remains as a whole life foreign matter (nonself) in the living body, tooth migration is barred or checking anagenesis is pointed out.

[0003] Since it has the outstanding tissue affinity and bone conduction nature, clinical application of calcium phosphate like hydroxyapatite (HAp:Hydroxyapatite;calcium<sub>10</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>6</sub>(OH)<sub>2</sub>) or beta-tricalcium phosphate (TCP:Tricalciumphosphate;calcium<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>) is carried out as living body hard-tissue alternate material.

[0004] However, the absorptance in the living body of the commercial reagent composition HAp is low, the existing bone and the homogeneous permutation are difficult and osteogenesis ability is not long-term necessarily an effective ingredient. Moreover, commercial absorptivity beta-TCP and a polylactic acid-glycolic-acid copolymer have very slow rate of absorption, and after clinical recovery remains for one - three years in the living body. Under the latest bone therapy, in connection with neostosis and the osteoanagenesis, permutation absorption is carried out in an osseous tissue in two - three months, and development of a biomaterial without the need for a secondary operation is expected.

[0005] In bone induction / playback research which used BMP, the collagen which has the fine structure of the body tissue resemblance containing a living body origin component as a charge of a living body absorber which was excellent in the cellular affinity attracts attention. However, the resistance original nature atelocollagen of medical application is a foreign protein, and since the abnormality prion protein which is a causative agent of mad cow disease (bovine spongiform encephalopathy) may be mixed at the time of an extract and purification, it is not an ingredient safe 100%. Since the design of a crosslinking bond etc. is difficult for a recombinant Homo sapiens collagen, by the culture system, the present condition is that the example of a success is not seen.

[0006] In ingredient development of the calcium phosphate using a living body bone, the method of producing a low crystallinity apatite is proposed by baking in the manufacture approaches, such as an approach, the patent number No. 2785245 natural hydroxyapatite, etc. which extract an apatite, by the apatite with a small specific surface area, or dissolution deposit preparation

from the art of W096/37433 bone charcoal (what distilled the animal bone dryly) and a product, a raw bone, and bone ash. Moreover, by the coating approach of a JP,10-102288,A phosphoric-acid compound, the method of producing the composite particle of a reagent apatite and the ceramics is shown by the spray drying method. since these ingredients have low living body absorptivity — clinical medicine and odontology — it is not a suitable BAOMIME tech ingredient for application of a field.

[0007]

[The technical problem which invention makes solution \*\*\*\*\*] clinical medicine and odontology — in the field, it permutes by absorption and the placode promptly with the recovery after an operation, and development of a collapse absorptivity calcium phosphate ingredient early in the living body which does not bar anagenesis is demanded strongly.

[0008] The living body bone of livestock, such as the cow bone produced by the processing process of livestock products, boiled pork ribs, \*\*\*\*, \*\*\*\*, \*\*\*\*, and a chicken bone, is an unused resource important for the \*\* student of environmental cycloid type society. In the whole country, about 450,000 per year since extensive disposal is carried out, especially as for the cow bone, the effective use and functional development are expected also in the view of the latest mad cow disease cure processing technique.

[0009] the calcium phosphate inclination functional material which used the living body bone as the raw material — the minute amount metal ion content low crystallinity of the living body origin — it is HAp, and since the specific surface area and surface type voice of a particle change depending on heat treatment conditions, the ratio of a different-species adsorption site and the control of a property to biopolymers and cells, such as BMP besides pore structure, are possible.

[0010]

[Means for Solving the Problem] The process at which claim 1 of this invention calcinates a living body bone (a sea surface bone and compact bone) in 773-1473K. According to the process immersed in a with a pH of two or less inorganic acid until it carries out the partial dissolution of the baking sea surface bone at the process which carries out the full dissolution of the baking compact bone, and its solution, the process which adds a base agent and holds pH to 8-11, the process to filter, the process to rinse, and the process to dry The fine structure of the sea surface osseous tissue origin which the cell built is held. Specific surface area from the activity surface layer more than 100m<sup>2</sup>/g to a deep part layer The body tissue inclination structure where the crystallinity of the calcium phosphate which re-deposited improves, and particle diameter changes from several nm to 1 micrometer. The calcium phosphate functionally gradient material (AbCP-GM) and its production approach of the body tissue origin characterized by the surface property resulting from the minute amount metal ion of the body tissue origin are shown.

[0011] In order that the process to calcinate may remove a collagen origin organic component, a carbon component may remain or less by 773K and the fine structure of the body tissue origin may disappear by sintering of a sea surface bone or more by 1473K, suitable burning-temperature range is 773-1473K.

[0012] The acid of the process which dissolves [ perfect ] and dissolves [ partial ] needs to be an inorganic acid at an organic acid, in order that the organic substance may remain. By two or more pH, since the dissolution rate of a living body bone is slow, an inorganic acid needs to be with a pH of two or less strong acid.

[0013] At the process which adds the base agent, the stable zone of various calcium phosphate changes with pH. By eight or less pH, a dibasic-calcium-phosphate (DCPD:Dicalcium Phosphate Dihydrate;CaHPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O) phase. An OKUTARIN acid calcium (OCP:Octacalcium Phosphate;calcium<sub>8</sub>H<sub>2</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>6</sub>·5H<sub>2</sub>O) phase By pH 8-9, since a HAp phase is generated by pH 9-11 and a calcium-hydroxide (calcium<sub>2</sub> (OH)) phase is generated for a beta-TCP phase by 11 or more pH, pH range by which HAp and beta-TCP suitable as living body hard-tissue alternate material are manufactured is 8-11.

[0014] The crystallinity of claim 2 of this invention of the calcium phosphate which re-deposited improves according to the process which carries out steam atmosphere heat treatment of the

ingredient of claim 1 in 673-1073K, and it shows the calcium phosphate inclination functional composite material (AbCP-GMH) characterized by surface properties, such as body tissue inclination structure which particle diameter and a mechanical strength increase, and outstanding biocompatibility, compatibility, and its production approach.

[0015] Suitable heat-treatment-temperature range is 673-1073K from the process to heat-treat not determining the handling condition of the suitable rate of absorption of calcium phosphate, and an ingredient, and the crystallinity of calcium phosphate and the mechanical strength of particle diameter and an ingredient not changing or less by 673K, but a HAp phase decomposing partially or more by 1073K.

[0016] According to the process which sinks in BMP, claim 3 of this invention makes the ingredient of claims 1 and 2 discover the joint synergistic effect of BMP, AbCP-GM and BMP, and AbCP-GMH, and shows BMP / calcium phosphate inclination functional composite material (BMP/AbCP-GM, BMP/AbCP-GMH) characterized by the body tissue inclination function to have the quick absorptivity which is not in the conventional calcium phosphate ingredient, and high bone induction potency, and its production approach to it.

[0017]

[Elements of the Invention] Body tissue origin calcium phosphate has the fine structure and the property of a life object which are not in a reagent composition ingredient. Holding the placode structure (a pore diameter, porosity, and minute amount metal ion) of the sea surface bone which the mesenchyme system cell built, it uses it with a crystal growth place, and this invention offers a high body tissue origin absorptivity calcium phosphate inclination functional composite material and its production approach of the freshness based on grant of a cell activity surface layer, and the concept of BAIOMI Metchik of controlling crystallinity and particle diameter from a surface layer to a deep part layer.

[0018] That is, in this invention, it is related with cell proliferation, the activity front face which was excellent in blood vessel invasiveness, the body tissue imitation calcium phosphate composite material which has inclination functionality, and its production approach using the placode structure of a living body cancellous bone according to the full dissolution and partial dissolution, a re-deposit of calcium phosphate, heat treatment, and the sinking-in process of BMP.

[0019] The living body bone was used as a start raw material. In order to carry out cutting processing of the living body bone which carried out frozen preservation at the suitable magnitude at the time of an animal embedding experiment and to remove a collagen origin organic component, it calcinates in [ 773-1473K ] boiling washing processing and air (although simple baking is also good, desirably). For example, the body tissue (compact bone and cancellous bone) origin apatite (b-HAp) was produced by 773K for 10 hours according to the process which carries out by 1073K 1173K for 10 hours, and carries out temperature up baking gradually like 20 hours by 1373K 1473K for 24 hours for 8 hours. In elevated-temperature baking of this living body bone, decomposition removal of the organic compounds, such as abnormality prion protein, is carried out completely, and only minute amount metal ion \*\*\*\* calcium phosphate, such as Na<sup>+</sup> and Mg<sup>2+</sup>, remains.

[0020] It dissolved in the inorganic acid after grinding the compact bone origin b-HAp. Etching and the partial dissolution of a particle front face were performed holding [ were immersed in the solution until it carried out the partial dissolution of another sea surface bone origin b-HAp, and ] the pore diameter of a cancellous bone, and porosity. The basic solution was added to it and the process held by the stable zone (pH 8-11) of beta-TCP or a HAp phase performed compound-ization of sea surface bone origin b-HAp and a dissolution deposit apatite (r-HAp). According to the process which filters it, washes and is dried, the crystallinity of specific surface area of calcium phosphate improved from the activity surface layer more than 100m<sup>2</sup>/g to the deep part layer, and it produced the body tissue origin calcium phosphate functionally gradient material (AbCP-GM) which has the inclination structure which particle diameter increases from several nm to 1 micrometer.

[0021] According to the process which heat-treats AbCP-GM in the steam ambient atmospheres 673-1073K, the body tissue origin calcium phosphate functionally gradient material

(AbCP-GMH) to which the crystallinity of calcium phosphate, absorptivity, collapsibility, reinforcement, etc. were changed was produced.

[0022] In order to promote bone induction potency, body tissue origin absorptivity calcium phosphate inclination functional composite material (BMP/AbCP-GM, BMP/AbCP-GMH) was produced according to the natural bone origin BMP or the process which produces in gene engineering or sinks pair NANTOHITO BMP etc. into AbCP-GM and AbCP-GMH.

[0023] Since the body tissue structure of the same compact bone and sea surface bone is used as a living body bone when a cow bone, boiled pork ribs, \*\*\*\*, \*\*\*\*, \*\*\*\*, a chicken bone, etc. are used for a raw material, AbCP-GM, AbCP-GMH, BMP/AbCP-GM, and BMP/AbCP-GMH are producible as a natural result with the same process.

[Example] Hereafter, the example of this invention is explained.

[0024]

[Example 1] Production of a body tissue origin absorptivity calcium phosphate functionally gradient material (AbCP-GM). The body tissue origin apatite (b-HAp) was produced according to the process which calcinates the cow femur of frozen preservation in [ 773-1473K ] cutting processing, the boiling washing processing by distilled water, and air in the suitable magnitude at the time of an animal embedding experiment (5x3x3mm, 12x9x3.5mm) (it is [ K / 773/ K / 10 hours and / 1073/ K / 10 hours and / 1173] 20 hours at 24 hours and 1473K in 8 hours and 1373K) (refer to drawing 1 ). It dissolved [ after grinding the compact bone origin b-HAp10g ] in 3 2000cm of 4.5% nitric-acid water solutions of pH1. It was immersed in the solution for 24 hours until it carried out the partial dissolution of another sea surface bone origin b-HAp12g. 3 was added 750cm of aqueous ammonia 50% to it, it was referred to as pH10.5, and the process held at a room temperature for 24 hours performed inclination functional compound-ization of sea surface bone origin b-HAp and a dissolution deposit apatite (r-HAp). The body tissue origin absorptivity calcium phosphate functionally gradient material (AbCP-GM) was produced according to the process which filters it, the process washed with distilled water, and the process dried by 323-393K for 24 hours (refer to drawing 2 ).

[0025] The chemical analysis of b-HAp by induction plasma emission spectral analysis (ICP) and r-HAp is shown in Tables 1 and 2, respectively. AbCP-GM which has the middle presentation of b-HAp and r-HAp contained a minute amount metal ion like  $Mg^{2+}$  of the living body origin, and Na, and was the calcium $^{2+}$  deficit mold HAp of mole-ratio =1.64-1.66 of calcium/P.

[0026] The minute X diffraction pattern of the deep part layer and surface layer of AbCP-GM is shown in drawing 3 and drawing 4 , respectively. Since the HAp single phase was obtained by Ryobe and the peak of each crystal face became sharp notably from the surface layer to the deep part layer, it turned out that AbCP-GM is a calcium phosphate functionally gradient material whose crystallinity of HAp improves to a deep part near the front face.

[0027] The surface organization of AbCP-GM by the scanning electron microscope (SEM) is shown in drawing 5 . It became clear that it is the nano-micro functionally gradient material to which many about 10nm needlelike fine crystals deposited in about 1-micrometer grain, an AbCP-GM particle holding the fine structure of a cancellous bone.

[0028]

[Example 2] Production of a body tissue origin absorptivity calcium phosphate functionally gradient material (AbCP-GMH). The body tissue origin absorptivity calcium phosphate functionally gradient material (AbCP-GMH) was produced for AbCP-GM of an example 1 according to the steam ambient atmospheres 673-1073K and the process heat-treated for 24 hours. It turned out that the crystallinity of AbCP-GMH of a surface layer HAp improves, growth of a HAp particle is observed with the rise of heat treatment temperature, and the mechanical strength of AbCP-GMH increases.

[0029]

[Example 3] Production of body tissue origin absorptivity BMP / calcium phosphate inclination functional composite material (BMP/AbCP-GM, and BMP/AbCP-GMH). Natural bone origin BMP5microg was dissolved in 15micro of distilled water l. Body tissue origin absorptivity calcium phosphate inclination functional composite material (BMP/AbCP-GM and BMP/AbCP-GMH) was produced according to the process which sinks into AbCP-GMH to which AbCP-GM of the

example 1 put into the sterilization petri dish and an example 2 heat-treated the BMP solution 673K.

[0030]

[Table 1] It is a chemical analysis by the induction plasma emission spectral analysis (ICP) of the body tissue (sea surface bone and compact bone) origin apatite (b-HAp) produced in the examples 1, 2, and 3.

化学組成	海面骨 %	緻密骨 %
CaO	54.28	54.67
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	41.29	41.87
MgO	0.95	0.94
Na <sub>2</sub> O	0.89	0.05
SiO <sub>2</sub>	0.05	0.03
SrO	0.03	0.03
K <sub>2</sub> O	0.02	0.02
BaO	0.02	0.02
合 計	97.53	98.53

[0031]

[Table 2] It is a chemical analysis by the [CP induction plasma emission spectral analysis of the dissolution deposit apatite (r-HAp) produced in the examples 1, 2, and 3.

化学組成	%
CaO	54.25
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	41.67
MgO	1.00
Na <sub>2</sub> O	0.05
SiO <sub>2</sub>	0.12
SrO	0.01
BaO	0.01
合 計	97.11

[0032] As a heterotopia bioassay, the AbCP-GM independent group, the BMP/AbCP-GM group, the AbCP-GMH independent group, and the BMP/AbCP-GMH group were set up, and AbCP-GM, BMP/AbCP-GM, AbCP-GMH, and BMP/AbCP-GMH which carried out refrigeration preservation by 277K were embedded at the regions-of-back hypodermically in-house using the Wistar system rat.

[0033]

[Example 4] Organization morphological evaluation of AbCP-GM. In the bioassay trial, after adding a phosphate buffer solution to AbCP-GM, it was embedded at the Wistar system rat regions-of-back hypodermically in-house. The embedding sample was extracted with time the 1, 2, 3, 4, 6, and 8 or 10-week back, hematoxylin-and-eosin (H-E) dyeing was performed, and the optical microscope (OM) performed organization morphological observation.

[0034] After one week of embedding, the absorption image by collapse and the giant cell of an apatite was seen.

[0035] OM photograph of a deashing H-E sample is shown in drawing 6 about AbCP-GM after four weeks of embedding. The apatite decreased to Tsuguaki, fibrous connective tissue was formed between the pores of an apatite, and the occupancy area of the apatite in the whole

embedding object by the morphometry result decreased to about 30% before embedding at the maximum. An apatite front face presents the shape of a wave, and the appearance of a multinucleated giant cell and the reservoir of the tissue fluid which the apatite absorbed are seen.

[0036] After ten weeks of embedding, the apatite was absorbed completely, and a check and extraction of an embedding object were impossible. The inflammatory cell infiltration which it lets all observation periods pass, is occupied by the fibrous tissue between the pores of a residual apatite, and makes a round cell a subject was slight.

[0037]

[Example 5] Organization morphological evaluation of BMP/AbCP-GM. In the bioassay trial, BMP/AbCP-GM was embedded like the example 4 at the Wistar system rat regions-of-back hypodermically in-house. The embedding sample was extracted with time with 1, 2, 3, 4, 6, and 8 or 10 weeks, HE staining was given, and OM performed organization morphological observation.

[0038] After one week of embedding, growth of an undifferentiated mesenchymal cell was seen in apatite pore. After two weeks of embedding, the induction bone formed in the apatite front face at addition nature was checked. After three weeks of embedding, the immature fiber bone and the part which a growth mesenchyme occupies were expanded.

[0039] OM photograph of a deashing H-E sample is shown in drawing 7 and 8 about BMP/AbCP-GM after four weeks of embedding. It turns out that active bone induction is accepted on the whole, and it is in a collapse absorption inclination while an apatite is covered with a new bone.

[0040] In drawing 7, while the initial body product of an embedding object is maintained mostly, an apatite decreases to Tsuguaki, on the whole, formation of continuous \*\*\*\*\* is seen, and a hematogenous myeloid tissue is observed. The apatite was [ the bone and the myeloid tissue of the occupancy area in the whole embedding object by morphometry ] about 71% about 29%.

[0041] In drawing 8, the apatite encapsulation-ized by the new bone is accepted, a multinucleated giant cell appears in the apatite front face which a bone-apatite presents the shape of a mosaic on the whole, and presents the shape of a wave, and the reservoir of tissue fluid is seen in an apatite. The residual of the apatite in an absorption process is also accepted in the bone matrix which enclosed much osteocytes.

[0042] By six weeks of embedding, and eight weeks, the tooth space of bone marrow was expanded, and after ten weeks of embedding, the apatite was absorbed and was permuted by the bone and the myeloid tissue.

[0043]

[Example 6] Organization morphological evaluation of AbCP-GMH and BMP/AbCP-GMH. In the bioassay trial, AbCP-GMH (673K heat treatment) and BMP/AbCP-GMH (673K heat treatment) were embedded like examples 4 and 5 at the Wistar system rat regions-of-back hypodermically in-house. The embedding sample was extracted with time with 1, 2, 3, and 4 or 8 weeks, HE staining was given, and OM performed organization morphological observation.

[0044] From AbCP-GM, by the process of heat treatment, since the mechanical strength was large, the handling of AbCP-GMH (673K heat treatment) at the time of a rat embedding operation was comparatively easier for BMP/AbCP-GMH (673K heat treatment) than BMP/AbCP-GM.

[0045] After 4-10 weeks of embedding, like examples 4 and 5, absorption of an apatite and formation of \*\*\*\*\* were accepted and \*\*\*\*\* was [ the direction of AbCP-GMH (673K heat treatment) and BMP/AbCP-GMH (673K heat treatment) ] the inclination for the collapse rate of absorption of an apatite to become slow from AbCP-GM, and BMP/AbCP-GM.

[0046]

[Example 7] Organization morphological evaluation of a commercial apatite (Algipore). It embedded like examples 4, 5, and 6 at the Wistar system rat regions-of-back hypodermically in-house, using a commercial apatite (product made from Algipore:FRIATEC) as a sample for contrast of examples 1, 2, and 3. This apatite is the chemosynthesis HAp of 1473K baking which has the ecology structure of the marine organism coral origin. The embedding sample was extracted with time with 1, 2, 3, 4, 6, and 8 or 10 weeks, HE staining was given, and OM performed organization morphological observation.

[0047] OM photograph of a deashing H-E sample is shown in drawing 9 about Aligipore after four-week embedding. Although it was occupied between apatite particles in fibrous connective tissue and the multinucleated giant cell has appeared on the apatite front face partially, a clear collapse absorption change is not accepted but the surface structure is flat. Although much the capillary's pores exist, it is the structure inferior to cell invasiveness.

[0048] After ten weeks of embedding, the volume decrease of an embedding object was not remarkable.

[0049] Since the accelerative bone induction by in-house absorptivity more prompt than the rat embedding trial of the AbCP-GM group of an example 4, the BMP/AbCP-GM group of an example 5, and the BMP/AbCP-GMH group of an example 6 and BMP concomitant use was observed, the ingredient of this invention showed the adsorption capacity which does not check an operation of Cytokine BMP, and it became clear that it was the outstanding absorptivity calcium phosphate ingredient which offers the scaffold of the cell proliferation differentiation to an osteoblast sequence.

[0050]

[Effect of the Invention] The ingredient of this invention has a 200 times larger specific surface area as compared with the conventional cow baking bone (TBC:True boneCeramic), and since physical structure, crystallinity, and a surface property are similar to the living body bone, outstanding cellular affinity and compatibility, and coincidence are provided with the calcium phosphate inclination functional composite material which has the organization regenerative capacity in the world which is not in existing living body alternate material, i.e., the fastest living body absorptivity and bone replaceability.

[0051] In addition, since current [ by which the cow origin collagen nature material is improved on the mad cow disease problem ], and this invention using a livestock baking bone carry out decomposition vaporization of the abnormality prion protein completely in a manufacture process, they are judged to be the functional material excellent in safety.

[0052] Therefore, the application expansion to the gene vector conveyance intelligent material for the culture support ingredient of association not only with the living body hard-tissue alternate material used abundantly in a clinical treatment site by using the bone inductivity and the absorption property in the living body resulting from bone related protein or cell adsorption capacity as a controllable ingredient but a physiological active substance, an embryonic stem cell, a somatic stem cell, and a bone marrow mesenchyme system stem cell and gene therapy will be possible for the ingredient of this invention in the future.

[0053] Furthermore, in order that this invention may respond to the transplantation needs for the osteoanagenesis and difficulty therapy disease accompanying aging society arrival, it is the viewpoint of the formation of altitude effective use of an unused resource (livestock living body bone), various application expansions are possible in the field of playback medicine and systems engineering as a new nano-micro functionally gradient material, and social / economical repercussion effect is expected.

---

[Translation done.]



\* NOTICES \*

JPO and NCIPi are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.\*\*\* shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

---

DESCRIPTION OF DRAWINGS

---

[Brief Description of the Drawings]

[Drawing 1] It is the appearance photograph of the cancellous bone origin apatite (b-HAp) produced in the examples 1 and 2.

[Drawing 2] It is the appearance photograph of the body tissue origin absorptivity calcium phosphate functionally gradient material (AbCP-GM) produced in the examples 1 and 2.

[Drawing 3] It is the minute X diffraction pattern of the body tissue origin absorptivity calcium phosphate functionally gradient material (AbCP-GM) deep part layer produced in the examples 1 and 2.

[Drawing 4] It is the minute X diffraction pattern of the body tissue origin absorptivity calcium phosphate functionally gradient material (AbCP-GM) surface layer produced in the examples 1 and 2.

[Drawing 5] It is the SEM photograph of the body tissue origin absorptivity calcium phosphate functionally gradient material (AbCP-GM) produced in the examples 1 and 2.

[Drawing 6] AbCP-GM shown in the example 4 It is OM photograph (H-E, x3 time) of the deashing H-E sample after four weeks of embedding.

[Drawing 7] BMP/AbCP-GM which showed in the example 5 It is OM photograph (H-E, x30 time) of the deashing H-E sample after four weeks of embedding.

[Drawing 8] It is OM photograph (the enlargement of drawing 7 , H-E, x50 time) of the deashing H-E sample after four weeks of BMP/AbCP-GM embedding shown in the example 5.

[Drawing 9] It is OM photograph (H-E, x25 time) of the deashing H-E sample after four weeks of commercial apatite (product made from Algipore:FRIATEC) embedding shown in the example 7.

---

[Translation done.]

\* NOTICES \*

JPO and NCIP1 are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

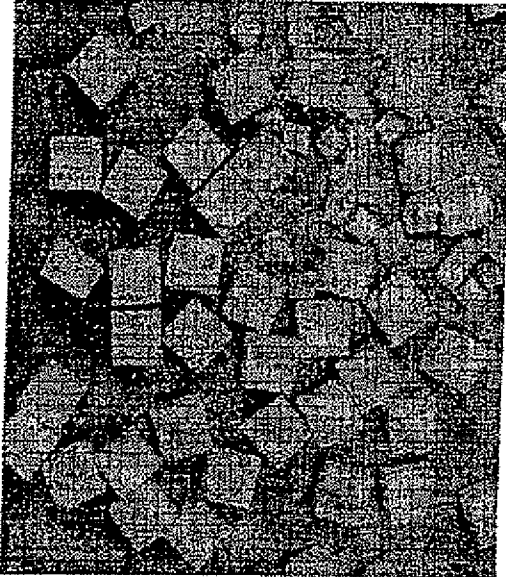
- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.\*\*\* shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

---

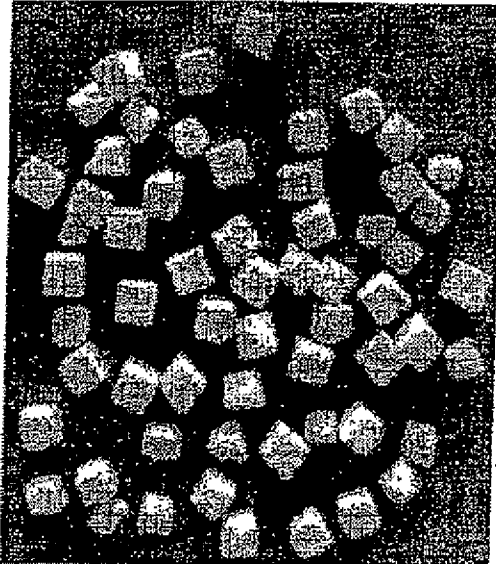
DRAWINGS

---

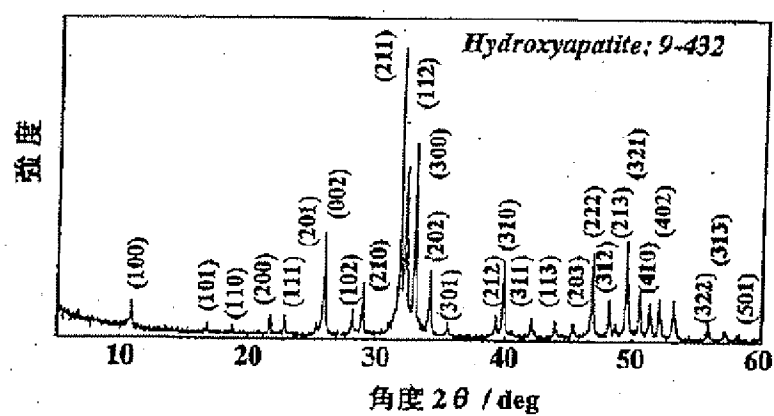
[Drawing 1]



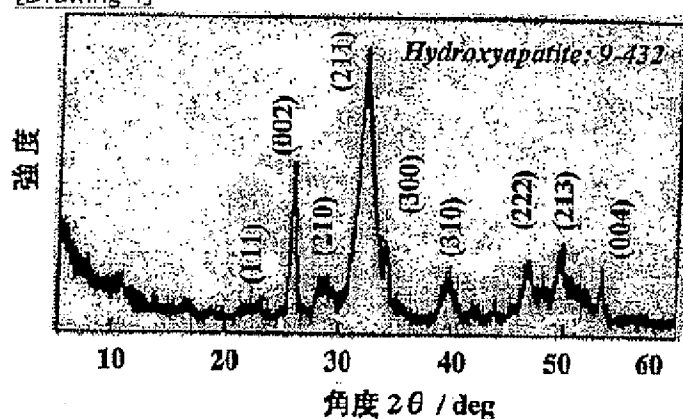
[Drawing 2]



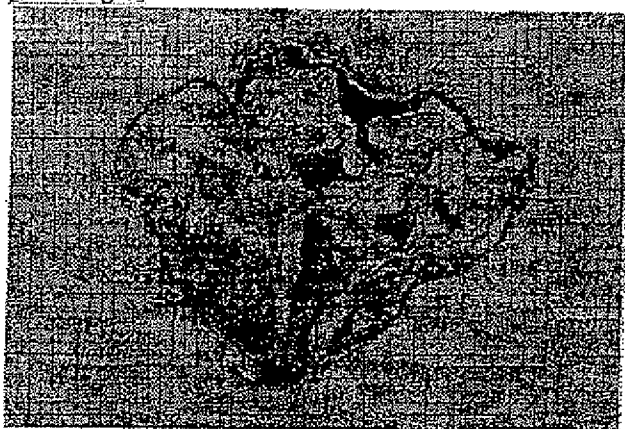
[Drawing 3]



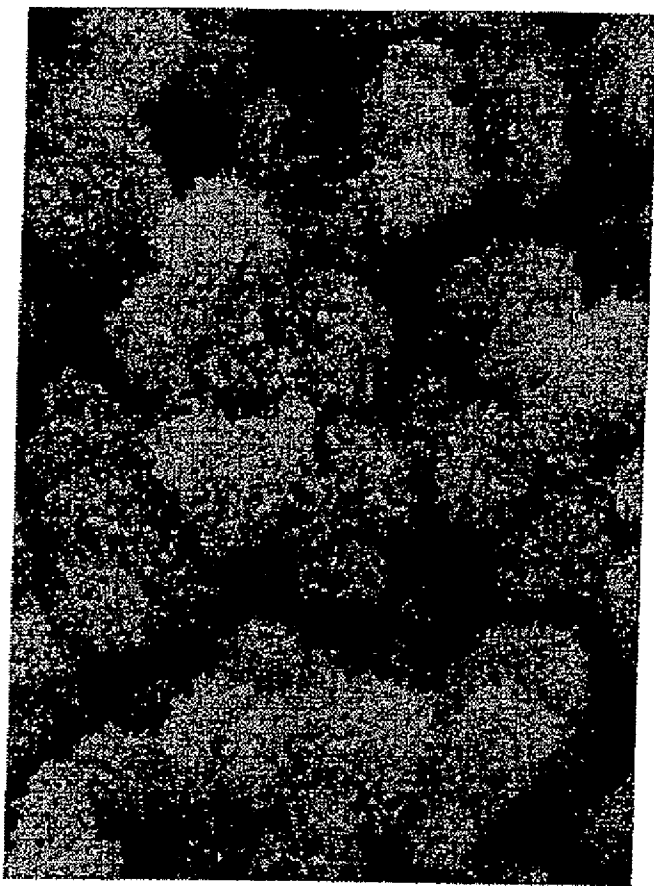
[Drawing 4]



[Drawing 6]

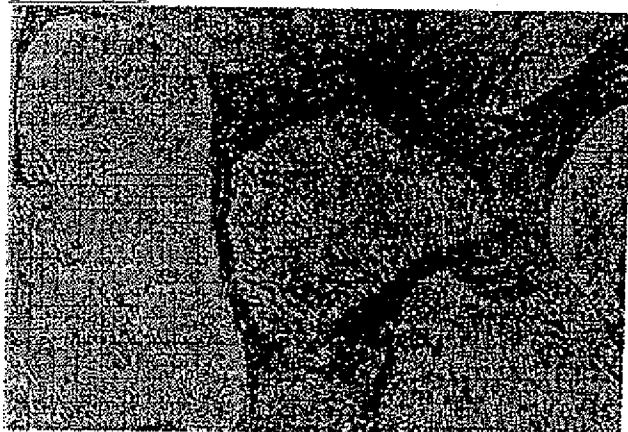


[Drawing 5]

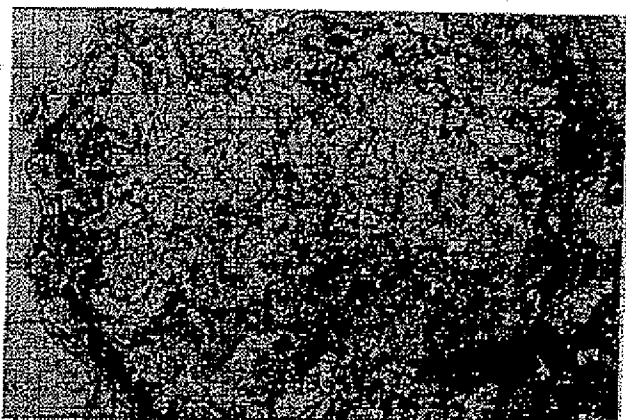


— 1  $\mu$  m

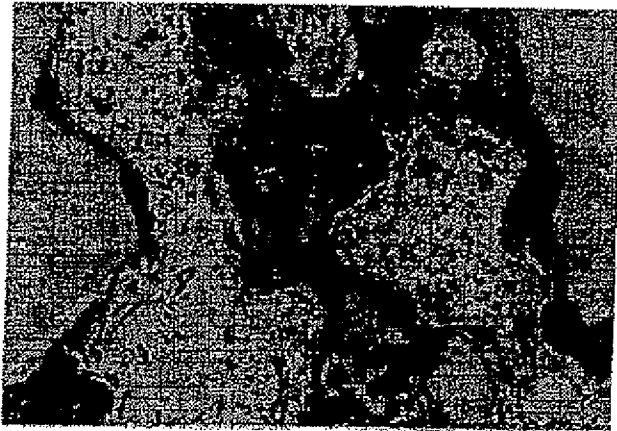
[Drawing 7]



[Drawing 8]



[Drawing 9]



---

[Translation done.]

(19)日本国特許庁 (J P)

(12)公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2003-210567

(P 2 0 0 3 - 2 1 0 5 6 7 A)

(43)公開日 平成15年7月29日(2003.7.29)

(51)Int.Cl.<sup>?</sup>

A61L 27/00

識別記号

F I

A61L 27/00

7-コード (参考)

G 4C081

審査請求 有 請求項の数3 書面 (全14頁)

(21)出願番号 特願2002-50515(P 2002-50515)

(22)出願日 平成14年1月21日(2002.1.21)

(71)出願人 593010394

赤澤 敏之

北海道札幌市北区北19条西11丁目1番地

北海道立工業試験場内

(71)出願人 502069503

村田 勝

北海道石狩郡当別町金沢1757 北海道医療

大学内

(71)出願人 502059950

有末 真

北海道石狩郡当別町金沢1757 北海道医療

大学内

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 生体組織由来吸収性リン酸カルシウム傾斜機能複合材料とその作製方法

(57)【要約】 (修正有)

【課題】 骨吸収性が速く、骨誘導再生能を有する生体組織由来の吸収性リン酸カルシウム傾斜機能複合材料とその作製方法を提供する。

【解決手段】 生体骨(海面骨・緻密骨)を焼成、その焼成緻密骨を無機酸に完全溶解、その溶液に焼成海面骨を部分溶解するまで浸漬、塩基剤を添加しpHを8~11に保持、濾過、水洗、乾燥、水蒸気雰囲気加熱処理、骨形成蛋白質を含浸する工程により、間葉系細胞が構築した海面骨組織由来の気孔径と気孔率、微量の生体由来金属イオンを保持しつつ、比表面積が100m<sup>2</sup>/g以上の活性表面層から深部層へ、リン酸カルシウムの結晶性が向上し、粒子径が数nmから1μmへ増加する傾斜機能複合材料を製造する。



## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 生体骨（海面骨・緻密骨）をそれぞれ773～1473Kの範囲で焼成する工程、pH2以下の無機酸に焼成緻密骨を完全溶解する工程、その溶液に焼成海面骨を部分溶解するまで浸漬する工程、塩基剤を添加しpHを8～11に保持する工程、濾過する工程、水洗する工程、乾燥する工程により、製造した材料とその作製方法。

【請求項2】 請求項1の材料を673～1073Kの範囲で水蒸気雰囲気熱処理する工程により、製造した材料とその作製方法。

【請求項3】 請求項1、2の材料に、骨形成蛋白質（BMP: Bone morphogenetic protein）を含浸する工程により、製造した材料とその作製方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、医療関連産業分野において、家畜焼成骨を高度有効活用した生体機能性材料の作製方法に関し、最先端の再生医療、組織工学の技術分野で必要不可欠な生体親和性・適合性、吸収性、骨誘導性及び強度を有する生体組織由来吸収性傾斜機能複合材料の作製方法を提供するものである。

## 【0002】

【従来の技術】 近年、高齢化社会の到来や交通事故の多発に伴う骨再建や骨再生医療を目的として、多種多様な生体硬組織代替材料が開発されている。顎裂等の骨欠損部では、歯牙移動や埋入材料植立のために、母骨と均質な骨置換が必要である。生体内非吸収性材料は生涯異物（非自己）として生体内に残存するため、歯牙移動を妨げたり、組織再生を阻害することが指摘されている。

【0003】 水酸アパタイト（HAp: Hydroxyapatite;  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ）やβ-リン酸三カルシウム（TCP: Tricalcium phosphate;  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ）のようなリン酸カルシウムは、優れた組織親和性と骨伝導性を有するため、生体硬組織代替材料として臨床応用されている。

【0004】 しかしながら、市販の試薬合成HApは生体内吸収能力が低く、既存骨と均質な置換は困難であり、骨形成能が長期的に必ずしも有効な材料ではない。また、市販の吸収性β-TCPやポリ乳酸-グリコール酸共重合体は吸収速度が極めて遅く、臨床的治療後も1～3年間、生体内に残存する。最近の骨治療では、骨新生・骨再生に伴い2～3ヶ月で骨組織に置換吸収され、2次手術の必要がない生体材料の開発が期待されている。

【0005】 BMPを使用した骨誘導・再生研究では、細胞親和性の優れた生体吸収材料として、生体由来成分を含有した生体組織類似の微細構造を有するコラーゲン

が注目されている。しかしながら、医療用の抵抗性アテロコラーゲンは異種蛋白質であり、狂牛病（牛海綿状脳症）の原因物質である異常プリオン蛋白質が抽出・精製時に混入される可能性があるため、100%安全な材料ではない。リコンビナントヒトコラーゲンは架橋結合等の設計が困難であるため、培養系では成功例が見られないのが現状である。

【0006】 生体骨を利用したリン酸カルシウムの材料開発では、W096/37433 骨炭（動物骨を乾留したもの）の処理方法及び生成物、生骨、骨灰からアパタイトを抽出する方法、特許番号第2785245号天然ヒドロキシアパタイト等及びその製造方法において、焼成により比表面積の小さいアパタイト、または、溶解析出調製により低結晶性アパタイトの作製法が提案されている。また、特開平10-102288 リン酸化合物のコーティング方法では、噴霧乾燥法により試薬アパタイトとセラミックスの複合粒子の作製法が示されている。これらの材料は、生体吸収性が低いため、臨床医学・歯学領域の応用に適当なバイオミメティック材料ではない。

## 【0007】

【発明が解決しようとする課題】 臨床医学および歯学領域では、手術後の治癒に伴い速やかに吸収、母組織に置換され、組織再生を妨げないような早期生体内崩壊吸収性リン酸カルシウム材料の開発が強く要望されている。

【0008】 畜産物の加工処理過程で産出される牛骨、豚骨、馬骨、羊骨、鹿骨及び鶏骨等のような家畜の生体骨は、環境循環型社会の創生には重要な未利用資源である。特に、牛骨は全国で年間約45万トンの大量廃棄処分されているため、最近の狂牛病対策処理技術の視点でも、その有効活用と機能性開発が期待されている。

【0009】 生体骨を原料としたリン酸カルシウム傾斜機能マテリアルは、生体由来の微量金属イオン含有低結晶性HApであり、熱処理条件に依存して粒子の比表面積や表面形態が変化するため、細孔構造の他、BMP等の生体高分子や細胞に対する異種吸着サイトの比率と性質の制御が可能である。

## 【0010】

【課題を解決するための手段】 本発明の請求項1は、生体骨（海面骨・緻密骨）を773～1473Kの範囲で焼成する工程、pH2以下の無機酸に焼成緻密骨を完全溶解する工程、その溶液に焼成海面骨を部分溶解するまで浸漬する工程、塩基剤を添加しpHを8～11に保持する工程、濾過する工程、水洗する工程、乾燥する工程により、細胞が構築した海面骨組織由来の微細構造を保持し、比表面積が $100\text{m}^2/\text{g}$ 以上の活性表面層から深部層へ、再析出したリン酸カルシウムの結晶性が向上し、かつ粒子径が数nmから $1\mu\text{m}$ へ変化する生体組織傾斜構造と、生体組織由来の微量金属イオンに起因する表面性質を特徴とする生体組織由来のリン酸カルシウム傾斜機能材料（AbCP-GM）とその作製方法を示

す。

【0011】その焼成する工程はコラーゲン由来有機成分を除去するものであり、773K以下では炭素成分が残留し、1473K以上では海面骨の焼結により生体組織由来の微細構造が消失するため、適当な焼成温度範囲は773～1473Kである。

【0012】その完全溶解・部分溶解する工程の酸は、有機酸では有機物が残留するため、無機酸であることが必要である。無機酸は、pH2以上では生体骨の溶解速度が遅いため、pH2以下の強酸であることが必要である。

【0013】その塩基剤を添加する工程では、pHによって各種リン酸カルシウムの安定領域が異なり、pH8以下では第2リン酸カルシウム(DCPD: Dicalcium Phosphate Dihydrate;  $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )相、オクタリン酸カルシウム(OCPO: Octacalcium Phosphate;  $\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ )相が、pH8～9で $\beta$ -TCP相が、pH9～11でHAp相が、pH11以上で水酸化カルシウム( $\text{Ca}(\text{OH})_2$ )相が生成されるため、生体硬組織代替材料として適当なHApや $\beta$ -TCPが製造されるpH範囲は8～11である。

【0014】本発明の請求項2は、請求項1の材料を673～1073Kの範囲で水蒸気雰囲気熱処理する工程により、再析出したリン酸カルシウムの結晶性が向上し、粒子径と機械的強度が増加する生体組織傾斜構造及び優れた生体親和性・適合性等の表面性質を特徴とするリン酸カルシウム傾斜機能複合材料(AbCP-GMH)とその作製方法を示す。

【0015】その熱処理する工程は、リン酸カルシウムの適当な吸収速度と材料のハンドリング状態を決定するものであり、673K以下ではリン酸カルシウムの結晶性と粒子径、材料の機械的強度が変化せず、1073K以上ではHAp相が部分的に分解することから、適当な熱処理温度範囲は673～1073Kである。

【0016】本発明の請求項3は、請求項1、2の材料に、BMPを含浸する工程により、BMPとAbCP-GM、BMPとAbCP-GMHの結合相乗効果を発現させ、従来のリン酸カルシウム材料にない速い吸収性と高い骨誘導性を有する生体組織傾斜機能特徴とするBMP/リン酸カルシウム傾斜機能複合材料(BMP/AbCP-GM、BMP/AbCP-GMH)とその作製方法を示す。

【0017】

【発明の具体的構成】生体組織由来リン酸カルシウムは、試薬合成材料にない生命体の微細構造と性質を有している。本発明は、間葉系細胞が構築した海面骨の母組織構造(気孔径、気孔率及び微量金属イオン)を保持しつつ、それを結晶成長場と利用し、細胞活性表面層の付

与、表面層から深部層へ結晶性と粒子径を制御するというバイオミメティックの概念に基づいた新規性の高い生体組織由来吸収性リン酸カルシウム傾斜機能複合材料とその作製方法を提供するものである。

【0018】すなわち、本発明では、生体海綿骨の母組織構造を利用して、完全溶解、部分溶解、リン酸カルシウムの再析出、熱処理、BMPの含浸工程により、細胞増殖と血管侵入性の優れた活性表面と傾斜機能性を有する生体組織模倣リン酸カルシウム複合材料とその作製方法に関するものである。

【0019】出発原料として、生体骨を用いた。冷凍保存した生体骨を動物埋入実験時の適当な大きさに切断加工し、コラーゲン由来有機成分を除去するため、煮沸洗浄処理、空気中773～1473Kで焼成(単純焼成もよいが、望ましくは、たとえば、773Kで10時間、1073Kで10時間、1173Kで8時間、1373Kで24時間、1473Kで20時間のように、段階的に昇温焼成)する工程により、生体組織(緻密骨・海綿骨)由来アパタイト(b-HAp)を作製した。この生体骨の高温焼成では、異常プリオン蛋白質等の有機化合物は完全に分解除去され、 $\text{Na}^+$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 等の微量金属イオン含むリン酸カルシウムのみが残存する。

【0020】その緻密骨由来b-HApを粉砕後、無機酸に溶解した。その溶液にもう一方の海面骨由来b-HApを部分溶解するまで浸漬し、海綿骨の気孔径、気孔率を保持しながら、粒子表面のエッチングと部分溶解を行った。それに塩基性溶液を添加し、 $\beta$ -TCPやHAp相の安定領域(pH8～11)で保持する工程により、海面骨由来b-HApと溶解析出アパタイト(r-HAp)の複合化を行った。それを濾過、洗浄、乾燥する工程により、比表面積が $100\text{m}^2/\text{g}$ 以上の活性表面層から深部層へ、リン酸カルシウムの結晶性が向上し、粒子径が数nmから $1\mu\text{m}$ へ増加する傾斜構造を有する生体組織由来リン酸カルシウム傾斜機能材料(AbCP-GM)を作製した。

【0021】AbCP-GMを水蒸気雰囲気673～1073Kで熱処理する工程により、リン酸カルシウムの結晶性、吸収性、崩壊性、強度等を変化させた生体組織由来リン酸カルシウム傾斜機能材料(AbCP-GMH)を作製した。

【0022】骨誘導性を促進するため、天然骨由来BMPまたは遺伝子工学的に作製したりコンビナントヒトBMP等をAbCP-GM、AbCP-GMHに含浸する工程により、生体組織由来吸収性リン酸カルシウム傾斜機能複合材料(BMP/AbCP-GM、BMP/AbCP-GMH)を作製した。

【0023】生体骨として、牛骨、豚骨、馬骨、羊骨、鹿骨及び鶏骨等を原料に用いた場合には、同様の緻密骨・海面骨の生体組織構造を利用するので、当然の結果として、同じ工程により、AbCP-GM、AbCP-G



MH、BMP/AbCP-GM及びBMP/AbCP-GMHを作製することができる。

【実施例】以下、本発明の実施例について説明する。

【0024】

【実施例1】生体組織由来吸収性リン酸カルシウム傾斜機能材料(AbCP-GM)の作製。冷凍保存の牛大腿骨を動物埋入実験時の適当な大きさ(5×3×3mm、12×9×3.5mm)に切断加工、蒸留水による煮沸洗浄処理、空気中773~1473Kで焼成(773Kで10時間、1073Kで10時間、1173Kで8時間、1373Kで24時間、1473Kで20時間)する工程により、生体組織由来アパタイト(b-HAp)を作製した(図1参照)。その緻密骨由来b-HAp10gを粉碎後、pH1の4.5%硝酸水溶液2000cm<sup>3</sup>に溶解した。その溶液に、もう一方の海面骨由来b-HAp12gを部分溶解するまで24時間浸漬した。それに50%アンモニア水750cm<sup>3</sup>を添加して、pH10.5とし、室温で24時間保持する工程により、海面骨由来b-HApと溶解析出アパタイト(r-HAp)の傾斜機能複合化を行った。それを濾過する工程、蒸留水で洗浄する工程、323~393Kで24時間乾燥する工程により、生体組織由来吸収性リン酸カルシウム傾斜機能材料(AbCP-GM)を作製(図2参照)した。

【0025】表1と2に、誘導プラズマ発光分光分析(ICP)によるb-HApとr-HApの化学分析値をそれぞれ示す。b-HApとr-HApの中間組成を有するAbCP-GMは、生体由来のMg<sup>2+</sup>、Na<sup>+</sup>のような微量金属イオンを含有し、Ca/Pのモル比=1.64~1.66のCa<sup>2+</sup>欠損型HApであった。

【0026】図3と図4に、AbCP-GMの深部層と表面層の微小X線回折パターンをそれぞれ示す。両方でHAp単一相が得られ、各結晶面のピークが表面層から深部層へ顕著に鋭くなることから、AbCP-GMは、表面近傍から深部へHApの結晶性が向上するリン酸カルシウム傾斜機能材料であることが分かった。

【0027】図5に、走査型電子顕微鏡(SEM)によるAbCP-GMの表面組織を示す。AbCP-GM粒子は、海綿骨の微細構造を保持しつつ、約1μmのグレインに約10nmの針状微細結晶が多数析出したナノミクロ傾斜機能材料であることが明らかになった。

【0028】

【実施例2】生体組織由来吸収性リン酸カルシウム傾斜機能材料(AbCP-GMH)の作製。実施例1のAbCP-GMを水蒸気雰囲気673~1073K、24時間熱処理する工程により、生体組織由来吸収性リン酸カルシウム傾斜機能材料(AbCP-GMH)を作製した。熱処理温度の上昇に伴い、AbCP-GMHは、表面層HApの結晶性が向上し、HAp粒子の成長が観察され、AbCP-GMHの機械的強度が増加することが

分かった。

【0029】

【実施例3】生体組織由来吸収性BMP/リン酸カルシウム傾斜機能複合材料(BMP/AbCP-GM及びBMP/AbCP-GMH)の作製。天然骨由来BMP5μgを蒸留水15μlに溶解した。そのBMP溶液を、滅菌シャーレに入れた実施例1のAbCP-GM及び実施例2の673K熱処理したAbCP-GMHに含浸する工程により、生体組織由来吸収性リン酸カルシウム傾斜機能複合材料(BMP/AbCP-GM及びBMP/AbCP-GMH)を作製した。

【0030】

【表1】実施例1、2、3で作製した生体組織(海面骨・緻密骨)由来アパタイト(b-HAp)の誘導プラズマ発光分光分析(ICP)による化学分析値である。

化学組成	海面骨 %	緻密骨 %
CaO	54.28	54.67
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	41.29	41.87
MgO	0.95	0.94
Na <sub>2</sub> O	0.89	0.95
SiO <sub>2</sub>	0.05	0.03
SrO	0.03	0.03
K <sub>2</sub> O	0.02	0.02
BaO	0.02	0.02
合計	97.53	98.53

【0031】

【表2】実施例1、2、3で作製した溶解析出アパタイト(r-HAp)のICP誘導プラズマ発光分光分析による化学分析値である。

化学組成	%
CaO	54.25
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	41.67
MgO	1.00
Na <sub>2</sub> O	0.05
SiO <sub>2</sub>	0.12
SrO	0.01
BaO	0.01
合計	97.11

【0032】異所性生物検定として、AbCP-GM単独群、BMP/AbCP-GM群、AbCP-GMH単独群、BMP/AbCP-GMH群を設定し、Wistar系ラットを用いて背部皮下組織内に、277Kで冷蔵保存したAbCP-GM、BMP/AbCP-GM、

AbCP-GMH、BMP/AbCP-GMHを埋入した。

【0033】

【実施例4】AbCP-GMの組織形態学的評価。生物検定試験では、AbCP-GMにリン酸緩衝液を添加した後、それをWistar系ラット背部皮下組織内に埋入した。1、2、3、4、6、8、10週後と経時的に埋入試料を摘出し、ヘマトキシリン-エオジン(H-E)染色を施して、光学顕微鏡(OM)により組織形態学的観察を行った。

【0034】埋入1週後では、アパタイトの崩壊と巨細胞による吸収像がみられた。

【0035】図6に、埋入4週後のAbCP-GMについて、脱灰H-E標本のOM写真を示す。アパタイトは著明に減少し、アパタイトの気孔間に線維性結合組織が形成され、形態計測結果による埋入物全体中アパタイトの占有面積は、最大で埋入前の約30%まで減少した。アパタイト表面は波状を呈し、多核巨細胞の出現とアパタイトが吸収した組織液の貯留がみられる。

【0036】埋入10週後では、アパタイトは完全に吸収され、埋入物の確認・摘出は不可能であった。全観察期間を通して、残留アパタイトの気孔間は線維組織で占められ、円形細胞を主体とする炎症性細胞浸潤は軽度であった。

【0037】

【実施例5】BMP/AbCP-GMの組織形態学的評価。生物検定試験では、実施例4と同様にして、BMP/AbCP-GMをWistar系ラット背部皮下組織内に埋入した。1、2、3、4、6、8、10週と経時的に埋入試料を摘出し、H-E染色を施して、OMにより組織形態学的観察を行った。

【0038】埋入1週後では、アパタイト気孔内に未分化間葉細胞の増殖がみられた。埋入2週後には、アパタイト表面に添加性に形成された誘導骨が確認された。埋入3週後では、幼弱な線維骨と増殖間葉組織が占める部分が拡大した。

【0039】図7と8に、埋入4週後のBMP/AbCP-GMについて、脱灰H-E標本のOM写真を示す。活発な骨誘導が全体的に認められ、アパタイトは新生骨に被われるとともに崩壊吸収傾向にあることが分かる。

【0040】図7では、埋入物の初期体積はほぼ維持されながら、アパタイトは著明に減少し、連続した梁状骨の形成が全体的にみられ、造血骨髓組織が観察される。形態計測による埋入物全体中の占有面積は、アパタイトが約29%、骨・骨髓組織が約71%であった。

【0041】図8では、新生骨に被包化されたアパタイトが認められ、骨-アパタイトは全体的にモザイク状を呈し、波状を呈するアパタイト表面には多核巨細胞が出現し、アパタイト内には組織液の貯留がみられる。骨細胞を多数封入した骨基質内に吸収過程にあるアパタイト

の残留も認められる。

【0042】埋入6週、8週では、骨髓のスペースが拡大し、埋入10週後では、アパタイトは吸収され、骨・骨髓組織に置換された。

【0043】

【実施例6】AbCP-GMH及びBMP/AbCP-GMHの組織形態学的評価。生物検定試験では、実施例4、5と同様にして、AbCP-GMH(673K熱処理)及びBMP/AbCP-GMH(673K熱処理)をWistar系ラット背部皮下組織内に埋入した。

1、2、3、4、8週と経時的に埋入試料を摘出し、H-E染色を施して、OMにより組織形態学的観察を行った。

【0044】AbCP-GMH(673K熱処理)はAbCP-GMより、BMP/AbCP-GMH(673K熱処理)はBMP/AbCP-GMより、熱処理の工程により機械的強度が大きいため、ラット埋入手術時のハンドリングが比較的容易であった。

【0045】埋入4~10週後では、実施例4、5と同様に、アパタイトの吸収と新成骨の形成は認められるが、AbCP-GMH(673K熱処理)及びBMP/AbCP-GMH(673K熱処理)の方がAbCP-GM及びBMP/AbCP-GMより、アパタイトの崩壊吸収速度は遅くなる傾向であった。

【0046】

【実施例7】市販アパタイト(Algipore)の組織形態学的評価。実施例1、2、3の対照用試料として、市販アパタイト(Algipore:FRIATEC社製)を用いて、実施例4、5、6と同様にして、Wistar系ラット背部皮下組織内に埋入した。このアパタイトは、海洋生物サンゴ由来の生態構造を有する1473K焼成の化学合成HApである。1、2、3、4、6、8、10週と経時的に埋入試料を摘出し、H-E染色を施して、OMにより組織形態学的観察を行った。

【0047】図9に、4週埋入後のAlgiporeについて、脱灰H-E標本のOM写真を示す。アパタイト粒子間は線維性結合組織で占められ、アパタイト表面に多核巨細胞が部分的に出現しているが、明白な崩壊吸収変化は認められず、表面構造は平坦である。細管様の気孔は多数存在しているが、細胞侵入性に劣る構造である。

【0048】埋入10週後でも、埋入物の体積減少は顕著でなかった。

【0049】実施例4のAbCP-GM群、実施例5のBMP/AbCP-GM群、実施例6のBMP/AbCP-GMH群のラット埋入試験より、速やかな組織内吸収性とBMP併用による加速的な骨誘導が観察されることから、本発明の材料はサイトカインBMPの作用を阻害しない吸着能を示し、骨芽細胞系列への細胞増殖分化

10

20

30

40

50

の足場を提供する優れた吸収性リン酸カルシウム材料であることが判明した。

#### 【0050】

【発明の効果】本発明の材料は、従来の牛焼成骨（TB C: True bone Ceramic）と比較して比表面積が200倍大きく、物理的構造、結晶性及び表面性質が生体骨に類似しているため、優れた細胞親和性・適合性と同時に、既存の生体代替材料にない組織再生能、すなわち、世界最速の生体吸収性と骨置換性を有するリン酸カルシウム傾斜機能複合材料を提供するものである。

【0051】なお、牛由来コラーゲン性マテリアルが狂牛病問題で見直されている現在、家畜焼成骨を利用する本発明は、製造過程で異常プリオン蛋白質を完全に分解揮散させることから、安全性に優れた機能性マテリアルと判断される。

【0052】したがって、本発明の材料は、将来、骨髄連蛋白質や細胞吸着能に起因する骨誘導性・生体内吸収特性を制御可能な材料として、臨床治療現場で多用される生体硬組織代替材料のみならず、生理活性物質との結合、ES細胞、体性幹細胞、骨髄間葉系幹細胞の培養担体材料、遺伝子治療のための遺伝子ベクター運搬インテリジェントマテリアルへの応用展開が可能である。

【0053】さらに、本発明は、高齢化社会到来に伴う骨再生や難治療疾患への移植ニーズに応えるため、未利用資源（家畜生体骨）の高度有効活用化の観点で、新規ナノミクロ傾斜機能材料として、再生医療、組織工学の分野で多種多様な応用展開が可能であり、社会的・経

済的波及効果が期待される。

#### 【図面の簡単な説明】

【図1】実施例1と2で作製した海綿骨由来アパタイト（b-HAp）の外観写真である。

【図2】実施例1と2で作製した生体組織由来吸収性リン酸カルシウム傾斜機能材料（AbCP-GM）の外観写真である。

【図3】実施例1と2で作製した生体組織由来吸収性リン酸カルシウム傾斜機能材料（AbCP-GM）深部層の微小X線回折パターンである。

【図4】実施例1と2で作製した生体組織由来吸収性リン酸カルシウム傾斜機能材料（AbCP-GM）表面層の微小X線回折パターンである。

【図5】実施例1と2で作製した生体組織由来吸収性リン酸カルシウム傾斜機能材料（AbCP-GM）のSEM写真である。

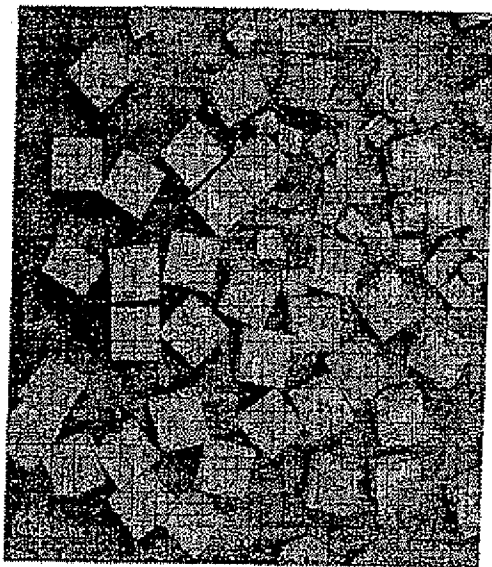
【図6】実施例4で示したAbCP-GM 埋入4週後の脱灰H-E標本のOM写真（H-E、×3倍）である。

【図7】実施例5で示したBMP/AbCP-GM 埋入4週後の脱灰H-E標本のOM写真（H-E、×30倍）である。

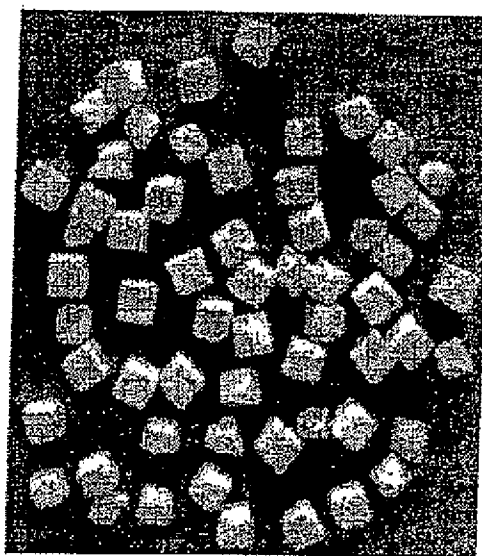
【図8】実施例5で示したBMP/AbCP-GM埋入4週後の脱灰H-E標本のOM写真（図7の拡大写真、H-E、×50倍）である。

【図9】実施例7で示した市販アパタイト（Aligipore: FRIATEC社製）埋入4週後の脱灰H-E標本のOM写真（H-E、×25倍）である。

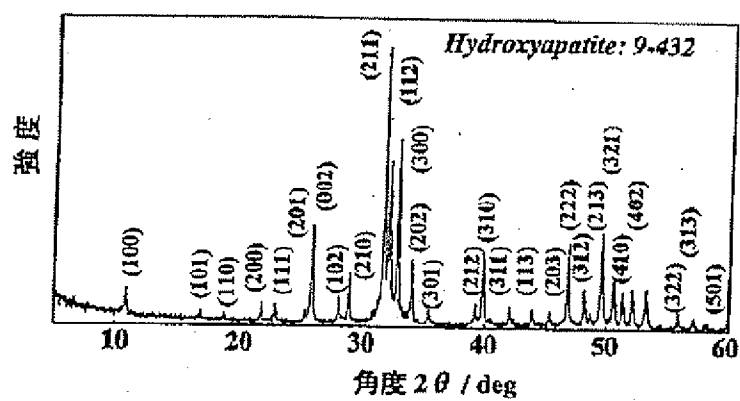
【図1】



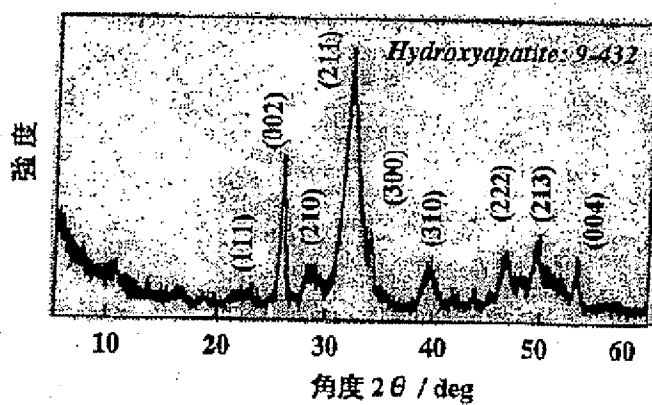
【図2】



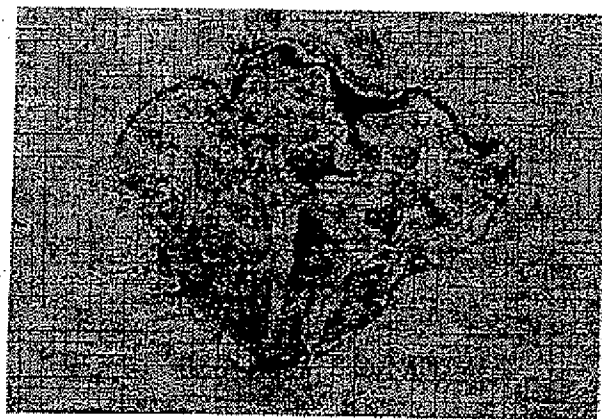
【図3】



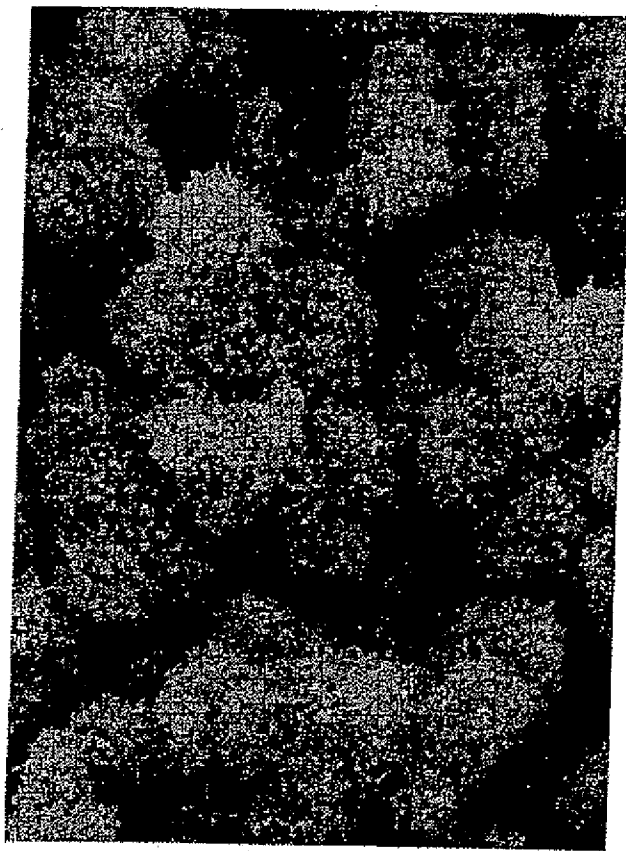
【図4】



【図6】

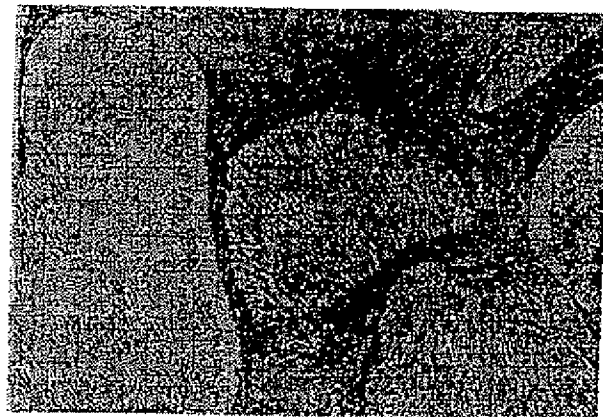


【図5】

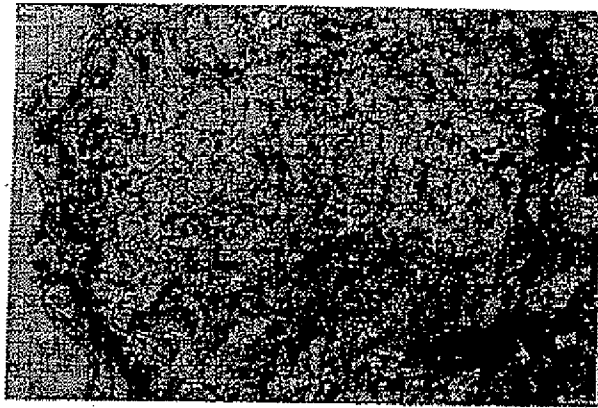


— 1  $\mu$  m

【図7】



【図8】



【図9】



## 【手続補正書】

【提出日】平成14年5月22日(2002.5.22)

## 【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】図6

【補正方法】変更

【補正内容】

【図6】実施例4で示したAbCP-GM 埋入4週後の脱灰H-E標本のOM写真(H-E、×3.7倍)である。

## 【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】図7

【補正方法】変更

【補正内容】

【図7】実施例5で示したBMP/AbCP-GM 埋

入4週後の脱灰H-E標本のOM写真(H-E、×3.5.9倍)である。

## 【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】図8

【補正方法】変更

【補正内容】

【図8】実施例5で示したBMP/AbCP-GM 埋入4週後の脱灰H-E標本のOM写真(図7の拡大写真、H-E、×58.2倍)である。

## 【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】図9

【補正方法】変更

【補正内容】

【図9】実施例7で示した市販アバタイト(Algip

ore: FRIATEC社製) 埋入4週後の脱灰H-E  
 標本のOM写真 (H-E、 $\times 30.3$ 倍) である。

【手続補正5】

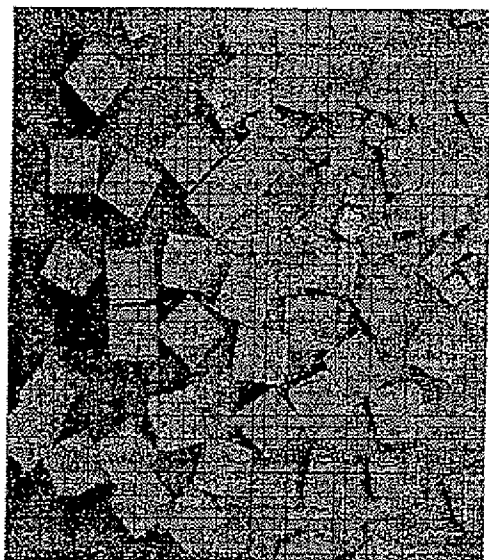
【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】全図

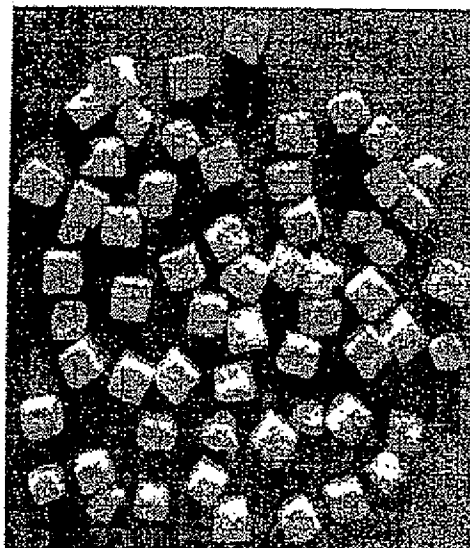
【補正方法】変更

【補正内容】

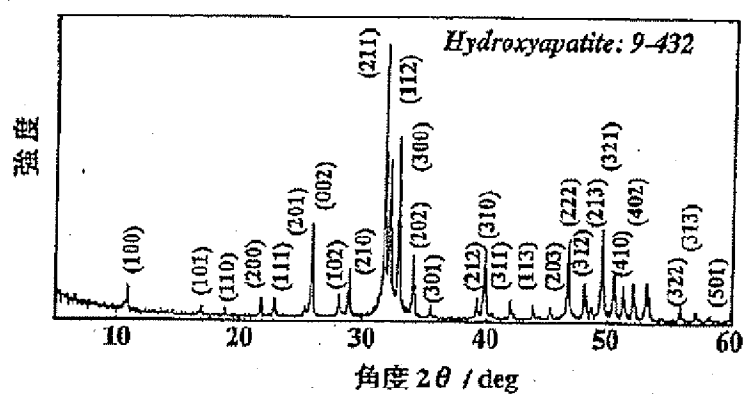
【図1】



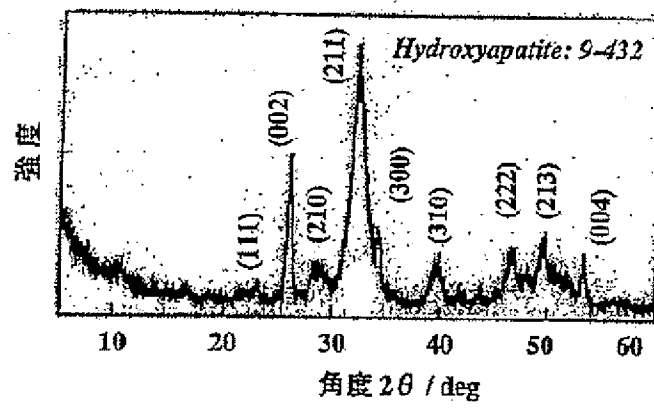
【図2】



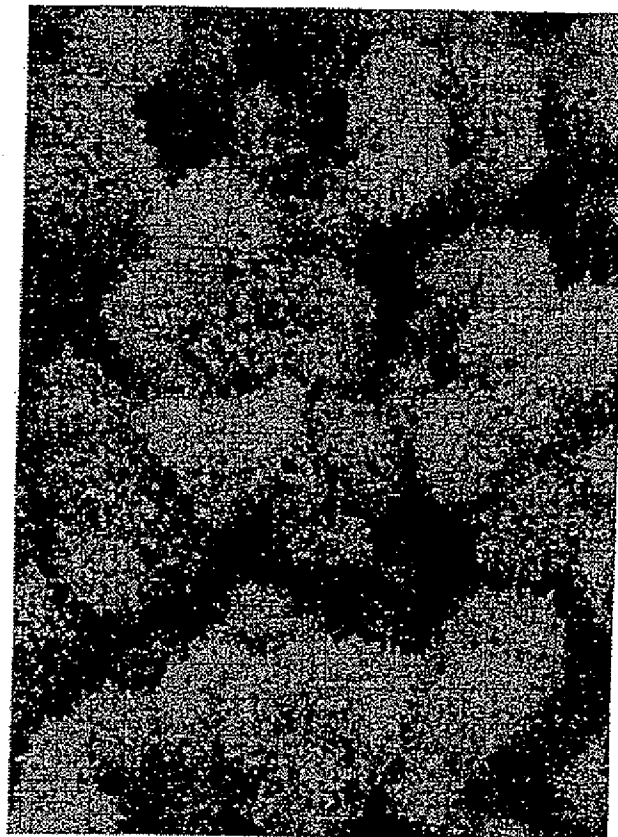
【図3】



【図4】

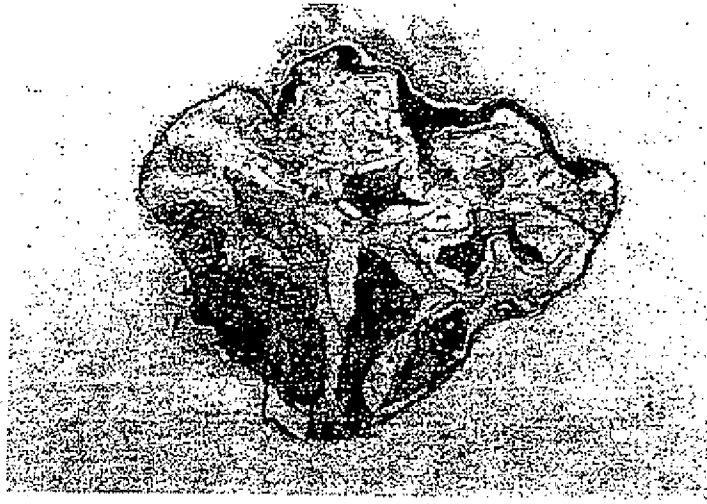


【図5】

— 1  $\mu$ m



【図6】



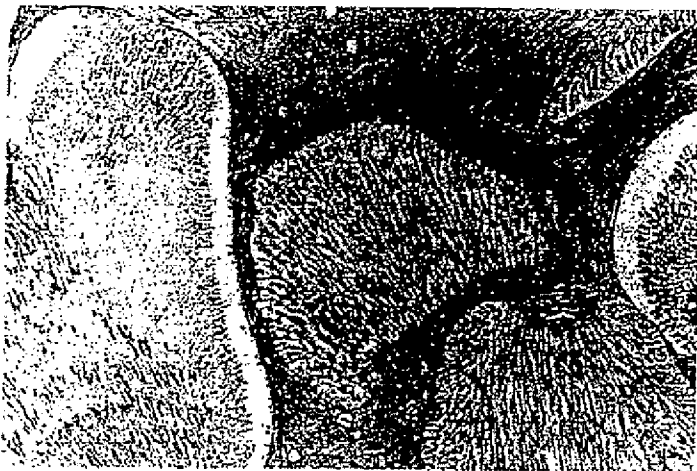
【図7】



【図8】



【図9】



フロントページの続き

(71)出願人 502069961

菅野 亨

北海道北見市公園町165 北見工業大学内

(71)出願人 300064342

小林 正義

北海道北見市公園町165番地 北見工業大学、化学システム工学科内

(72)発明者 赤澤 敏之

北海道札幌市北区北19条西11丁目1番地  
北海道立工業試験場内

(72)発明者 村田 勝

北海道石狩郡当別町金沢1757 北海道医療大学内

(72)発明者 有末 眞

北海道石狩郡当別町金沢1757 北海道医療大学内

(72)発明者 菅野 亨

北海道北見市公園町165 北見工業大学内

(72)発明者 小林 正義

北海道北見市公園町165 北見工業大学内

Fターム(参考) 4C081 AB03 AB04 BA13 BA14 BA16  
BC01 CD34 CF25 CF26 DA01  
DB05 DB06 DC14 EA02 EA04  
EA06 EA12